



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer:

0 205 790
A2

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 86104889.0

51 Int. Cl.⁴: C 12 M 3/00

22 Anmeldetag: 10.04.86

30 Priorität: 18.06.85 DE 3521684
26.08.85 DE 3530440

71 Anmelder: Dr. Müller-Lierhelm KG Biologische
Laboratorien, Behringstrasse 6, D-8033 Planegg (DE)

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 30.12.86
Patentblatt 86/52

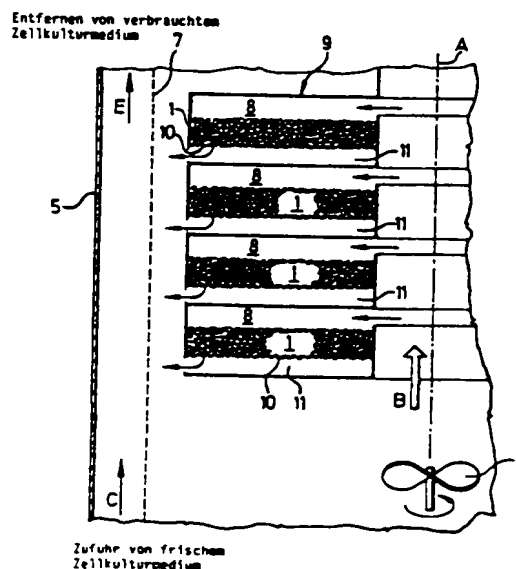
72 Erfinder: Müller-Lierhelm, Wolfgang Georg Konrad, Dr.,
Lichtweg 5, D-8032 Gräfelfing (DE)
Erfinder: Beiter, Andreas Hubertus, Dr.,
Agricolastrasse 83, D-8000 München 21 (DE)

84 Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI NL
SE

74 Vertreter: Nöth, Heinz, Dipl.-Phys., Patentanwalt
Müllerstrasse 1, D-8000 München 5 (DE)

54 Träger für die Kultivierung von menschlichen und/oder tierischen Zellen in einem Fermenter.

57 Ein Träger für die Kultivierung von menschlichen und/oder tierischen Zellen in einem Fermenter mit einem polymeren Grundkörper aus einem zu einer druckfesten Matrix geformten Feststoff mit einem für das flüssige Zellkulturmedium durchlässigen Kapillarsystem, in welchem kein Zellwachstum erfolgt und mit Zwischenräumen für dreidimensionales Zellwachstum, an deren Begrenzungsflächen Wachstumsfaktoren für menschliche und/oder tierische Zellen kovalent gebunden sind. Es wird hierdurch eine hohe Zelldichte in der Größenordnung von 10^9 Zellen/ml durch dreidimensionales Zellwachstum erreicht.



EP 0 205 790 A2

Träger für die Kultivierung von menschlichen und/oder tierischen Zellen
in einem Fermenter

Die Erfindung betrifft einen Träger nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Um das Anwachsen von adhären ten tierischen und/oder menschlichen Zellen an der festen Fläche eines Substrats zu erreichen, ist es erforderlich, daß das Substrat eine Oberflächenbeschaffenheit aufweist, die ein gutes

10 Anheften der Zellen ermöglicht. Es ist bekannt, daß elektrisch positiv oder negativ geladene Oberflächen als Substrat geeignet sind. Ferner sind Anheft- bzw. Wachstumsfaktoren bekannt, zum Beispiel bivalente Kationen, Fibronectin oder Serum, die auf Kunststoffoberflächen aufgebracht werden, und die das Anhaften und Wachstum der Zellen erleichtern. Die elektrische

15 Ladung der Substratoberfläche bewirkt eine Adsorption der Anheft- bzw. Wachstumsfaktoren, an denen die Zellen anwachsen. Bestimmte Zelltypen können Fibronectin selbst synthetisieren und sind daher von sich aus in der Lage, auf geladenen Kunststoffflächen anzuwachsen, z.B. diploide Fibroblasten. Andere Zellen jedoch benötigen den Zusatz von Serum oder Fibro-

20 nectin zum Kulturmedium. Der Zusatz von Serum bzw. Fibronectin als Anheftfaktor bzw. Wachstumsfaktor verteuert die Kultivierung von Zellen beträchtlich und ist in vielen Fällen, beispielsweise bei der Herstellung von Therapeutika, unerwünscht.

25 Adhären te tierische und menschliche Zellen, insbesondere Bindegewebszellen, bilden einen Zellrasen, der nur eine Zellschicht, einen sogenannten Monolayer, zuläßt. Das bedeutet, daß die Zellen nur zwei di-

mensional wachsen. Um hohe Zelldichten zu erreichen, die bei einer technischen Anwendung benötigt werden, ist die Verwendung großer Oberflächen erforderlich. Dies erreicht man zum Beispiel durch Verwendung kugelförmiger Trägerkörper (Microcarrier), die aus vernetztem Dextran bestehen, an dessen Oberfläche denaturiertes Collagen kovalent gebunden ist. Die schleimartigen Dextrankörper werden durch Umrühren im Kulturmedium verteilt. Durch die weiche Konsistenz der Trägerkörper soll bei Kollisionen zwischen den Trägerkörpern während des Umrührens eine Beschädigung oder Abrieb der angewachsenen Zellen vermindert werden. Wenn die bewachsenen Trägerkörper miteinander in Berührung kommen und aneinander haften, kann eine dreidimensionale Zellkultur erreicht werden (Broschüre "Microcarrier cell culture principles & methods" der Firma Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala). Hierdurch läßt sich jedoch kein gezieltes dreidimensionales Zellwachstum erreichen, welches Voraussetzung ist, um Zelldichten (etwa 10^9 Zellen/ml) zu erreichen, wie sie im menschlichen bzw. tierischen Körper vorkommen.

Bekannt ist außerdem das Hohlfasermodul, durch das das Zellkulturmedium hindurchgeschickt wird. Das Zellwachstum erfolgt in den Faserzwischenräumen. Hierbei bildet sich in Längsrichtung des Hohlfasermoduls ein Gradient der Zellversorgung mit dem Zellkulturmedium aus.

Bekannt sind außerdem poröse Keramikpatronen, durch die das Zellkulturmedium hindurchgeschickt wird. Ferner ist die Mikroverkapselung der Zellen bekannt, wobei Zellen in Na-Alginat eingekapselt werden und die Alginattröpfchen mit einem polymeren Netzwerk umschlossen werden. Das

Alginate wird dann aus dem Netzwerk herausgelöst. Auch bei diesen bekannten Verfahren können Zelldichten in der Größenordnung von nur etwa 10^7 Zellen/ml erreicht werden.

- 5 Aufgabe der Erfindung ist es daher, einen Träger der eingangs genannten Art zu schaffen, mit dem ein Zellwachstum mit Zelldichten bis annähernd den im menschlichen oder tierischen Körper vorhandenen Zelldichten von 10^9 Zellen/ml. erreicht wird.
- 10 Bei einem Trägerkörper nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1 wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 gelöst.

- Bei der Erfindung bildet der Grundkörper ein gegen Druck, insbesondere
- 15 Strömungsdruck, formstabiles Festbett, in welchem das Zellwachstum stattfindet. Dieses Festbett weist zwei unterschiedliche innere formstabile Zwischenraumbereiche auf, von denen die einen Zwischenräume durch die Umrißform von Perlen eines Perlpolymerisats gebildet werden können und dem dreidimensionalen Zellwachstum dienen. Die anderen
- 20 kapillaren Zwischenräume des Feststoffbetts können durch Makroporen der Perlen des Polymerisats gebildet werden, wobei diese Makroporen so geringe Porendurchmesser besitzen, daß Zellen nicht hineinwachsen können, jedoch eine Möglichkeit für das Hindurchfließen des flüssigen Zellkulturmediums bieten, so daß die Versorgung der Zellen mit Medium
- 25 und der Abtransport von Stoffwechselprodukten der Zellen gewährleistet bleibt. Auf diese Weise erhält man ein kontinuierliches Zellwachstum. Der durch die Erfindung geschaffene Träger kann mithin ein Baustein

eines wirtschaftlich arbeitenden Gewebefermenters sein, in welchem tierische und menschliche Zell-Linien in Massenkultur gehalten werden.

Durch Ausbildung des Trägerkörpers als feste, nicht bewegte Matrix kann
5 eine Anordnung für ein dreidimensionales Wachstum tierischer oder menschlicher Zellen geschaffen werden. Die Trägerkörper sind mit Wachstumsfaktoren beschichtet. Die Wachstumsfaktoren sind an die Grenzfläche zwischen der festen Matrix zu den Zwischenräumen gebunden, in die hinein das dreidimensionale Zellwachstum erfolgt.

10

Die Matrix besitzt ein Kapillarsystem (z.B. die Makroporeen des Perlpolymerisats), in das die Zellen nicht hineinwachsen können und welches aber zur Versorgung der Zellen mit Zellkulturmedium und zum Abtransport von Stoffwechselprodukten der Zellen dient. Die Matrix kann von perl-
15 förmigen Grundkörpern gebildet werden, die, wie schon erwähnt, makroporös ausgebildet sein können, wobei die Poren das Kapillarsystem bilden. Die Oberflächen der Perlen sind mit den Wachstumsfaktoren beschichtet und bilden in der Matrix die Begrenzungsflächen der Zwischenräume, in denen das dreidimensionale Zellwachstum stattfindet.

20

In vorteilhafter Weise kann bei der Verwendung des erfindungsgemäßen Trägers auf den Zusatz von Serum bzw. Fibronectin oder anderer Anheft- und Wachstumsfaktoren zum Kulturmedium verzichtet werden. Bei der Erfindung sind die Anheft- bzw. Wachstumsfaktoren, welche Glycoproteine, insbe-
25 sondere aus Serum und hier bevorzugt aus fötalem Kälberserum, sowie Fibronectin sein können, bevorzugt über Oxiran-Gruppen kovalent an die Ober-

fläche des polymeren Grundkörpers gebunden. Als perlförmiges Material für den polymeren Grundkörper eignet sich beispielsweise das im Handel erhältliche und in "forum mikrobiologie" 8 (1985) S. 296 beschriebene Perlpolymerisat.

5

Zur Bindung der Anheft- bzw. Wachstumsfaktoren an den Trägerkörper, insbesondere an die Flächen, welche die Zwischenräume umfassen, in denen das dreidimensionale Wachstum erfolgt, können durch andere kovalente Bindungsformen erfolgen, wie sie beispielsweise aus "Angewandte Chemie 94" (1982), Seite 838 oder "Chemiker-Zeitung", 97. Jahrgang (1973),
10 Nr. 11, Seite 612 bekannt sind.

Durch Beladung der erfindungsgemäßen Trägerkörper, welche die Anheft- bzw. Wachstumsfaktoren an ihrer Oberfläche besitzen, mit Feederzellen,
15 z.B. mit Makrophagen, können biologisch aktive Trägermaterialien hergestellt werden, mit deren Hilfe sich auch empfindliche Zellen in synthetischem Medium ohne Serumzusätze kultivieren lassen. Durch Verwendung entsprechender Wachstumsfaktoren kann die Zellvermehrung, aber auch der Sekundärstoffwechsel, optimiert werden.

20

Anhand der beiliegenden Figuren wird an einem Ausführungsbeispiel die Erfindung noch näher erläutert. Es zeigt:

Fig. 1 schematisch eine Teilansicht eines Trägers als Ausführungs-
25 beispiel, der gebildet ist aus Perlpolymerisat und

Fig. 2 schematisch einen Gewebefermenter, in welchem der Träger aus

Perlpolymerisat als Festbett in bestimmter Anordnung zum Einsatz kommt.

In der Fig. 1 ist in schematischer Darstellung ein kleiner Ausschnitt
5 eines matrixförmigen Trägers 1 gezeigt, der von einem Polymerisat gebildet wird. Perlen 2 des Perlpolymerisats besitzen Durchmesser von etwa 50 bis 300 μm , insbesondere 200 μm . Die Perlen 2 besitzen Makroporen 3, deren Porendurchmesser geringer als 10 μm ist, insbesondere 0,1 bis 3,0 μm . Die Oberflächen der Perlen 2 sind mit Wachstumsfaktoren
10 (Peptide, Proteine, Hormone etc.) für tierische oder menschliche Zellen beschichtet. Diese Oberflächen bilden Begrenzungsflächen für Zwischenräume 4, in denen das dreidimensionale Zellwachstum erfolgt. Die Makroporen 3 der Zellen bilden ein Kapillarsystem, in welches die Zellen nicht hineinwachsen können, da der Zelldurchmesser ca. 20 μm beträgt.
15 Dieses Kapillarsystem ist durchlässig für das flüssige Wachstumsmedium, so daß eine Versorgung der Zellen mit dem Medium und der Abtransport von Stoffwechselprodukten der Zellen nicht nur während der Wachstumsphase, sondern auch in der Produktionsphase (stationäre Phase) stattfinden kann. Dieser Stoffaustausch wird durch einen bestimmten Störungs-
20 druck erreicht, der in dem Fermenter erzeugt wird.

In der Fig. 2 ist schematisch eine Teilansicht eines Fermenters dargestellt, in welchem in Schichtform Träger 1, welche beispielsweise nach dem Ausführungsbeispiel der Fig. 1 angeordnet sind, als Bestandteil
25 des Fermenters zum Einsatz kommen. Die Schichtdicke kann je nach zu kultivierender Zellart zwischen 0,5 und 30 mm liegen. Der Fermenter

besitzt einen zylindrischen Fermentermantel 5, in dessen Achse A ein ortsfester Rührer 6 im unteren Teil des Fermenters angeordnet ist. Im Innern des Fermenters sind übereinander in ringförmigen Schichten die Träger 1 um die Achse A angeordnet. Zwischen der Anordnung der Träger 1 5 und dem Fermentermantel 5 befindet sich eine semipermeable Folie 7. Durch den Rührer 6, der auch durch ein Pumpwerk ersetzt sein kann, wird Zellkulturmedium entlang der Achse A in einer Strömung in Richtung eines Pfeiles B zentral und axial im Fermenter nach oben transportiert. Die Zufuhr von Zellkulturmedium in den Fermenter kann in Richtung ei- 10 nes Pfeiles C zwischen dem Fermentermantel 5 und der semipermeablen Folie 7 erfolgen. Die Strömungsrichtung entlang der Achse A kann auch von oben nach unten gerichtet sein.

Die in Richtung des Pfeiles B zentrale Hauptströmung des Zellkultur- 15 mediums verzweigt sich radial nach außen in die zwischen den Schichten des Trägers 1 gebildeten Zwischenräume 8. Das in die Zwischenräume 8 über den Trägern 1 befindliche Zellkulturmedium besitzt einen Strömungsdruck, der von dem durch den Rührer 6 gebildeten Pumpwerk herrührt. Aufgrund dieses Strömungsdruckes gelangt das Zellkulturmedium in die 20 Matrix der übereinander in Schichten angeordneten Träger 1 und strömt durch dieses von oben nach unten hindurch.

Die Träger 1 sind in dem in der Fig. 2 dargestellten Rahmen 9 auf Sieben 10 angeordnet. Auf diese Weise wird gewährleistet, daß das Zellkulturmedium nach dem Hindurchtritt durch die schichtförmigen Träger 1 25 nach unten in Zwischenräume 11 gelangen kann. Während des Durchtritts

durch die Träger 1 gibt das Zellkulturmedium Nährstoffe für das Zellwachstum ab. Auch beim Zuwachsen der Zwischenräume 4 durch dreidimensionales Zellwachstum wird ein Durchtritt des Zellkulturmediums und der Abtransport von Stoffwechselprodukten der Zellen aus den Trägern 1 5 gewährleistet, weil, wie schon im Zusammenhang mit der Fig. 1 erläutert, ein Kapillarsystem vorhanden ist, das beim Ausführungsbeispiel durch die Perlporen gebildet wird, in welches die Zellen nicht hineinwachsen können und welches ausreicht, um die Zellen mit weiterem frischen Zellkulturmedium, das aus den Zwischenräumen 8 kommt, zu versorgen und Stoff- 10 wechselprodukte der Zellen nach dem Durchtritt durch die Träger 1 in die Zwischenräume 11 zu transportieren. Aus den Zwischenräumen 11 gelangt das Zellkulturmedium radial nach außen. Niedermolekulare Stoffe werden durch die semipermeable Folie 7 hindurch ausgetauscht. Das "erneuerte" Medium wird nach oben in Richtung eines Pfeiles E aus dem Fer- 15 menter entfernt. Proteine als Produkte des Sekundärstoffwechsels der Zellen werden zurückgehalten und angereichert.

Das Zellkulturmedium kann in herkömmlicher Weise Aminosäuren, Kohlenstoffquellen, insbesondere Glucose und Zusätze wie Sauerstoff und Koh- 20 lensäure und gegebenenfalls Serum, enthalten. Die Wahl des Zellkulturmediums hängt von der Art der zu kultivierenden Zellen ab.

Durch die Entfernung des verbrauchten Nährmediums in Richtung des Pfeiles E wird gewährleistet, daß die Lactatkonzentration im Fermenter nie- 25 drig gehalten wird, so daß das Zellwachstum nicht beeinträchtigt wird.

Die Zufuhr von frischem Zellkulturmedium kann natürlich auch innerhalb der zylindrischen semipermeablen Folie 7 erfolgen.

Patentansprüche:

1. Träger für die Kultivierung von menschlichen und/oder tierischen Zellen in einem Fermenter mit einem polymeren Grundkörper, an dessen Oberfläche Wachstumsfaktoren für menschliche und/oder tierische Zellen kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß der Grundkörper
5 im Fermenter aus einem zu einer druckfesten Matrix geformten Feststoff mit einem für das flüssige Zellkulturmedium durchlässigen Kapillarsystem gebildet ist, in welchem kein Zellwachstum erfolgt, und mit Zwischenräumen für dreidimensionales Zellwachstum, an deren Begrenzungsflächen die Wachstumsfaktoren gebunden sind.
10
2. Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Grundkörper ortsfest im Fermenter angeordnet ist und vom Zellkulturmedium durchströmt ist.
- 15 3. Träger nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Grundkörper in Form einer oder mehrerer Schichten (Lamellen) im Fermenter angeordnet ist und in Richtung der Schichtdicke (senkrecht zur Lamelle) vom Zellkulturmedium durchströmt ist.
- 20 4. Träger nach einem der Ansprüche 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Grundkörper von einem porösen Perlpolymerisat gebildet ist.
5. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet,

daß das Perlpolymerisat einen Perldurchmesser von 30 bis 1000 μm aufweist.

6. Träger nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Perlpoly-
5 merisat einen Perldurchmesser von 50 bis 300 μm aufweist.

7. Träger nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
daß die Perlporen weniger als 10 μm Durchmesser besitzen.

10 8. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet,
daß das den Grundkörper bildende Polymerisat derart ausgebildet ist,
daß die Bindung der Wachstumsfaktoren (Peptide, Proteine, Hormone)
über Oxirangruppen an die Polymerisatoberfläche erfolgt.

15 9. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
daß die Wachstumsfaktoren Glycoproteine (Blutserum oder Bestandteile
davon, Fibronectin, fötales Kälberserum und dgl.) sind.

10. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
20 daß die Wachstumsfaktoren eine Kombination aus Stoffwechselprodukten
von Zellen und auf biochemischem Weg modifizierten Naturprodukten sind.

11. Träger nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet,
daß der Grundkörper auf einem Sieb im Fermenter angeordnet ist und von
25 oben nach unten vom Zellkulturmedium durchströmt ist.

12. Träger nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß im hohl-
zylindrisch ausgebildeten Fermenter eine längs der Zylinderachse ge-
führte zentrale Strömung des Zellkulturmediums vorhanden ist, die in
radialer Richtung sich über die jeweils in horizontalen Schichten über-
5 einander im Fermenter angeordneten Grundkörper radial nach außen ver-
zweigt und durch den Strömungsdruck durch den Grundkörper fließt.

13. Träger nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den
horizontal übereinander angeordneten Schichten des Grundkörpers zwei
10 Zwischenräume gebildet sind, von denen der eine Zwischenraum für das
in radialer Richtung sich verzweigende Zellkulturmedium und der andere
Zwischenraum zum radial nach außen gerichteten Führen des durch den
jeweiligen Grundkörper geflossenen Zellkulturmediums dienen.

FIG. 1

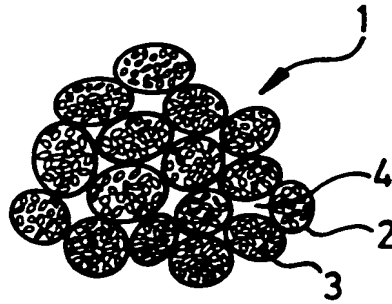
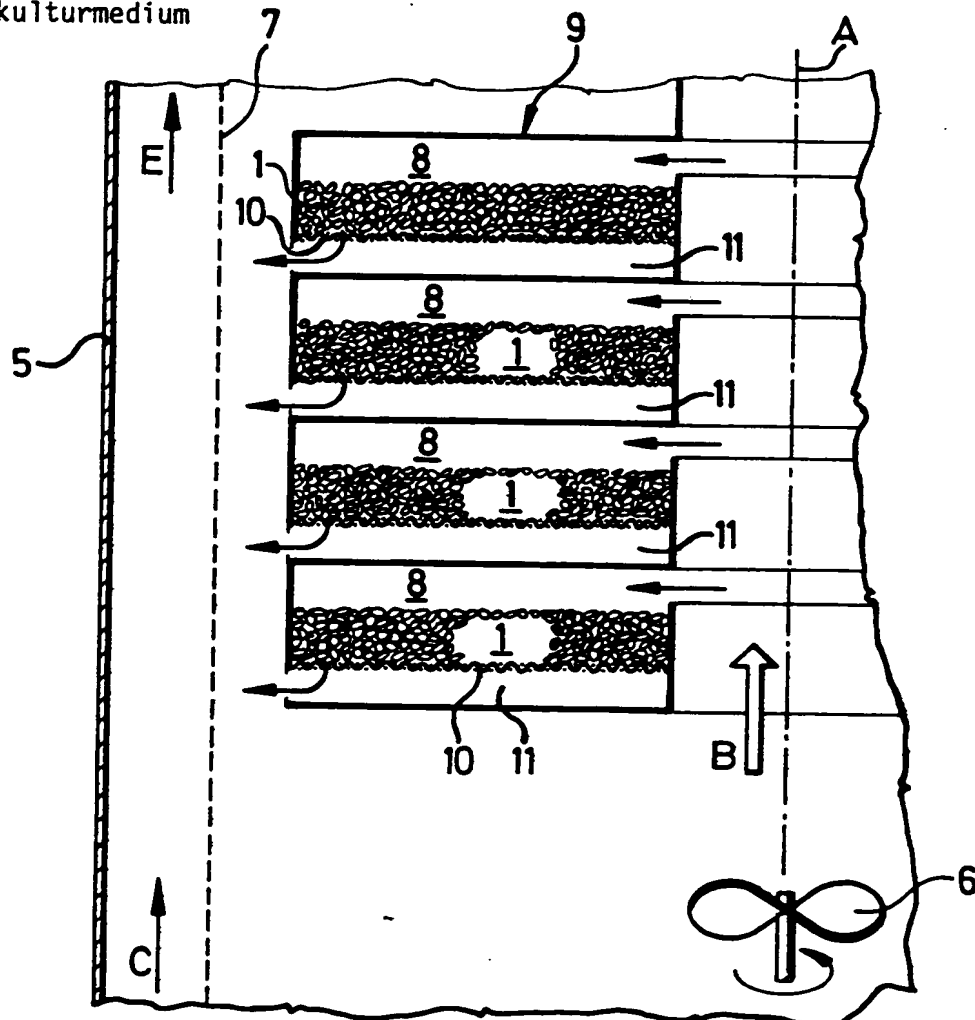
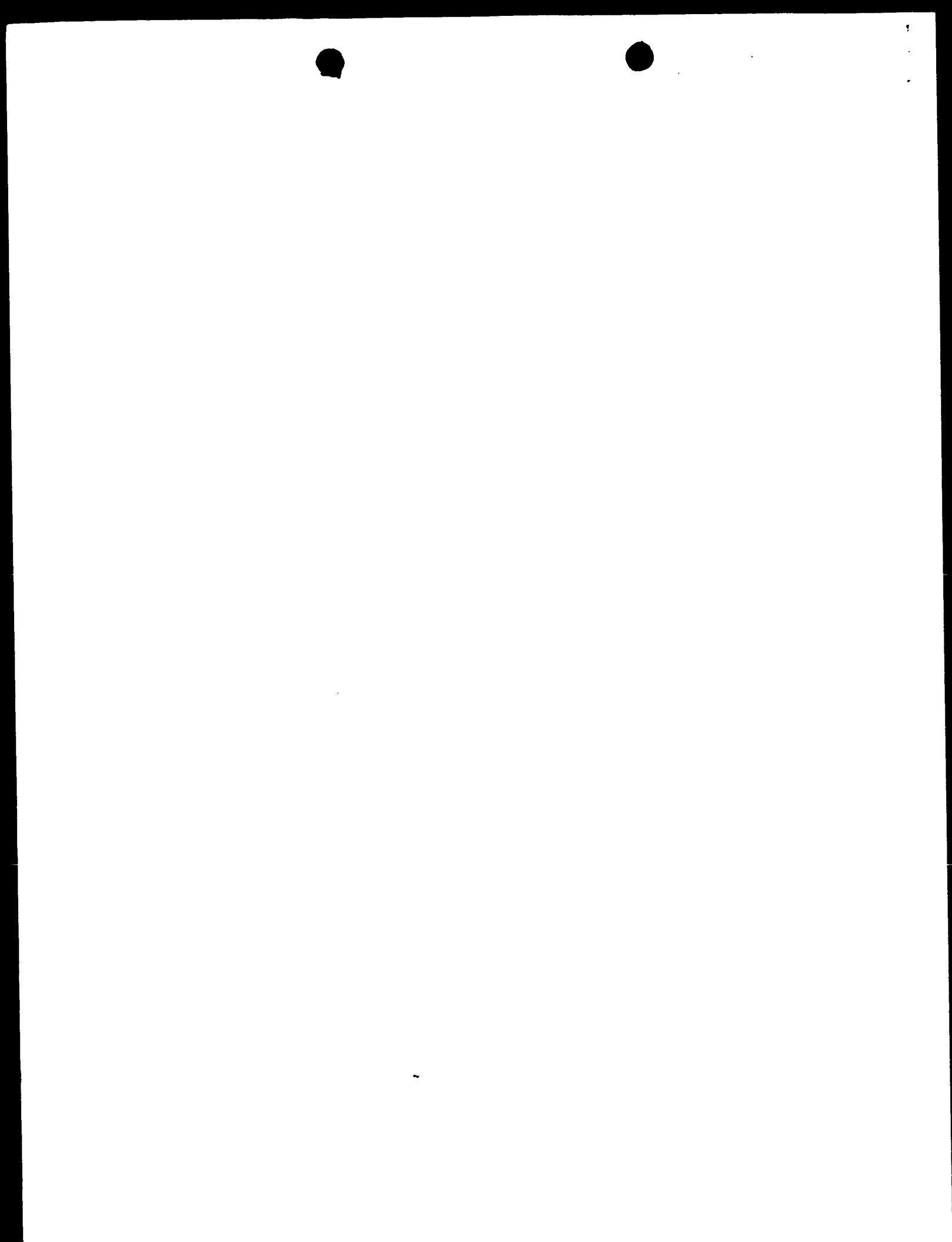


FIG. 2

Entfernen von verbrauchtem Zellkulturmedium 7



Zufuhr von frischem
Zellkulturmedium





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

0 205 790
A3

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑰ Anmeldenummer: 86104889.0

⑤① Int. Cl.⁴: C 12 M 3/00

⑳ Anmeldetag: 10.04.86

③① Priorität: 18.06.85 DE 3521684
26.08.85 DE 3530440

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung: 30.12.86
Patentblatt 86/52

⑧④ Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI NL
SE

⑧⑥ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 15.03.89 Patentblatt 89/11

⑦① Anmelder: Dr. Müller-Lierhelm KG Biologische
Laboratorien, Behringstrasse 6, D-8033 Planegg (DE)

⑦② Erfinder: Müller-Lierhelm, Wolfgang Georg Konrad, Dr.,
Lichtweg 5, D-8032 Gräfelfing (DE)
Erfinder: Belter, Andreas Hubertus, Dr.,
Agricolastrasse 83, D-8000 München 21 (DE)

⑦④ Vertreter: Nöth, Heinz, Dipl.-Phys., Patentanwälte
Pfenning, Meinig & Partner Mozartstrasse 17,
D-8000 München 2 (DE)

⑤④ Träger für die Kultivierung von menschlichen und/oder tierischen Zellen in einem Fermenter.

⑤⑦ Ein Träger für die Kultivierung von menschlichen und/oder tierischen Zellen in einem Fermenter mit einem polymeren Grundkörper aus einem zu einer druckfesten Matrix geformten Feststoff mit einem für das flüssige Zellkulturmedium durchlässigen Kapillarsystem, in welchem kein Zellwachstum erfolgt und mit Zwischenräumen für dreidimensionales Zellwachstum, an deren Begrenzungsflächen Wachstumsfaktoren für menschliche und/oder tierische Zellen kovalent gebunden sind. Es wird hierdurch eine hohe Zelldichte in der Größenordnung von 10^9 Zellen/ml durch dreidimensionales Zellwachstum erreicht.

EP 0 205 790 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0205790

Nummer der Anmeldung

EP 86 10 4889

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE

Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
A	EP-A-0 046 681 (MONSANTO CO.) ---		C 12 M 3/00
A	EP-A-0 092 302 (BECTON, DICKINSON and CO.) -----		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
			C 12 N C 12 M
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 06-12-1988	Prüfer REMP P G. L. E.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			